

Ero1-PDI酸化経路によるHIF-1alpha発現制御についての検討

| | |
|-----|---|
| 著者 | 平田 佑太 |
| URL | http://hdl.handle.net/10236/00028920 |

Ero1-PDI 酸化経路による HIF-1 α 発現制御についての検討

関西学院大学大学院 理工学研究科
生命医化学専攻 今岡研究室 平田佑太

Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) は低酸素応答系における重要な転写因子である。HIF-1 α は酸素濃度依存的に制御を受けており、通常酸素状態ではユビキチン・プロテアソーム系によって分解されているが低酸素状態では安定化している。当研究室の先行研究において、タンパク質のジチオール・ジスルフィドの相互変換を触媒する酸化還元酵素である Protein disulfide isomerase (PDI) によって HIF-1 α の発現が制御されていること、そして PDI による HIF-1 α の制御には PDI の酸化還元活性が重要であるということが明らかとされている。PDI が効率的に基質へとジスルフィド結合を導入するためには、分子状酸素を基質とし PDI を直接酸化する酸化酵素である Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (Ero1) が必要である。卒業研究において Ero1 によって HIF-1 α が不安定化することを明らかとしている。しかしながら Ero1-PDI による HIF-1 α の不安定化がどのように行われているのかは未だ不明な点が多い。そこで Ero1-PDI 酸化経路による HIF-1 α の制御機構の解明を本研究の目的とした。まず分子状酸素を基質とする Ero1 が低酸素条件下において PDI を酸化することができるのかどうかを、PEG-maleimide を用いて検討した。PEG-maleimide はチオール基に特異的に結合する試薬であり、ジスルフィド結合を切断することで生成した遊離チオール基と反応させることで SDS-PAGE 上でシフトアップしたバンドを検出することができる。その結果、Ero1 は低酸素条件下においても通常酸素条件下と同程度に PDI を酸化することが明らかとなった。次に Ero1 の高活性型変異体と不活性型変異体を作製し、Ero1 の酸化活性が PDI へ及ぼす影響を検討した。その結果、高活性型変異体は野生型と比較して PDI への強い酸化が見られ、免疫沈降法によって強い相互作用が見られた。一方、不活性型変異体は PDI への酸化が見られず、相互作用が見られなかった。次に Ero1 の高活性型変異体、不活性型変異体の過剰発現が HIF-1 α の発現量に与える影響を検討したところ、高活性型変異体によって野生型と比べて HIF-1 α の発現量はより減少したが、不活性型変異体によっては HIF-1 α の発現量の変化は見られなかった。このことから、Ero1 は HIF-1 α の発現制御に関与しており、これには Ero1 の酸化活性が重要な役割を持つことが示唆された。また、Ero1 と HIF-1 α の相互作用を免疫沈降法によって検討したところ、Ero1 と HIF-1 α の相互作用が見られなかったことから、Ero1 による HIF-1 α の発現制御は直接的な作用によるものではないことが考えられた。そこで、PDI のノックダウンと Ero1 の過剰発現を同時に行ったところ、Ero1 過剰発現時に見られる HIF-1 α の発現量の低下が見られなくなった。このことから Ero1 は PDI を介して HIF-1 α の発現を制御していることが示唆された。次に Ero1 が HIF-1 α のジスルフィド結合形成に影響を与えるのかどうかを PEG-maleimide を用いて検討した。その結果、Ero1 の野生型と高活性型変異体を加えた際にはシフトアップしたバンドが検出されたが、不活性型変異体を加えた際にこれは検出されなかった。これらの結果より、Ero1 は PDI の酸化を介して HIF-1 α のジスルフィド結合を形成し、その発現を制御している可能性が示唆された。